

WO2004098631

Publication Title:

ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT METHOD

Abstract:

Abstract of WO2004098631

The invention relates to antibodies which are used in the preparation of a medicament for the treatment of Alzheimer's disease. More specifically, the invention relates to the use of an antibody specifically recognising any one of the predominant variants of the amyloid beta peptide, Ab40 and Ab42, in the preparation of a medicament that is used to prevent and/or treat Alzheimer's disease. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de Noviembre de 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/098631 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 38/17,
39/00, A61P 25/28

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/000194

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de Mayo de 2004 (03.05.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200301054 8 de Mayo de 2003 (08.05.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA [ES/ES]; C/Baltasar
Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): SARASA
BARRIO, Manuel [ES/ES]; C/ Baltasar Gracián 1, Entlo.,
E-50005 Zaragoza (ES).

(74) Mandatario: ARAUZO PÉREZ, Jesús; Director de Otri-
Universidad de Zaragoza, C/ Baltasar Gracián 1, Entlo.,
E-50005 Zaragoza (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT METHOD

(54) Título: MÉTODO DE TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

(57) Abstract: The invention relates to antibodies which are used in the preparation of a medicament for the treatment of Alzheimer's disease. More specifically, the invention relates to the use of an antibody specifically recognising any one of the predominant variants of the amyloid beta peptide, Ab40 and Ab42, in the preparation of a medicament that is used to prevent and/or treat Alzheimer's disease.

(57) Resumen: Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El uso de un anticuerpo, que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, Ab40 y Ab42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

WO 2004/098631 A1

MÉTODO DE TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La presente invención se relaciona con un método de
5 tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas
con la presencia de depósitos amiloides, entre las que
se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

Se conocen ciertos hechos acerca de los fenómenos
bioquímicos y metabólicos asociados con la presencia de
la enfermedad de Alzheimer (AD). Dos cambios
morfológicos e histopatológicos observados en cerebros
15 con enfermedad de Alzheimer son las marañas
neurofibrilares (NFT) y los depósitos amiloides. Las
marañas neurofibrilares intraneuronales está presentes
también en otras enfermedades neurodegenerativas, pero
la presencia de los depósitos amiloides tanto en los
20 espacios intraneuronales (placas neuríticas) como en
las proximidades de la microvasculatura (placas
vasculares) parece ser característico de la enfermedad
de Alzheimer. De estas, las placas neuríticas parecen
ser las más frecuentes (Price, D.L., y col., Drug
25 Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un
péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido
amiloide A β 4.

30

El péptido amiloide A β 4 es un polipéptido originado por
proteolisis a partir de unas glucoproteínas de membrana
denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide
A β 4 (β APP). Estando estas proteínas, precursoras del
35 péptido amiloide, constituidas por 695 a 770

aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del
5 péptido amiloide A β 4, el péptido A β 40 y el A β 42, de 40
y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una
distribución tisular diferente en condiciones tanto
fisiológicas como patológicas. Es la variante de 42
aminoácidos la forma predominante en las placas
10 amiloides localizadas en cerebros de enfermos de
Alzheimer.

Hasta la fecha se han propuesto diferentes posibles
soluciones hacia una posible vacuna frente a la
15 enfermedad de Alzheimer.

En EP526511 se propone la administración de dosis
homeopáticas de A β a pacientes con AD preestablecida.
Sin embargo, debido a que las dosis empleadas apenas
20 varían los niveles de A β endógeno circulante en plasma,
no se espera ningún beneficio terapéutico.

Schenk et al., (Nature, 1999 ; 400 : 173-177) describe
la inmunización con A β 42, de ratones transgénicos
25 PDAPP, los cuales sobreexpresan APP mutante humana,
preveniendo la formación de placas amiloides, distrofia
neurítica y astrogliosis.

En WO9927944 (Schenk D.) se describe el tratamiento de
30 AD por administración de A β 42 a un paciente.

Un ensayo clínico de fase II en 360 pacientes
diagnosticados con media a moderada AD en 4 países
Europeos y Estados Unidos en el que se empleaba péptido
35 amiloide A β 42 como antígeno, fue discontinuado tras

reportarse encefalitis en algunos de los pacientes (Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16[7]:22, Apr. 1, 2002).

- 5 El problema de emplear como vacuna una proteína endógena (o una proteína presente naturalmente en el animal que está siendo vacunado), como es en el caso de el péptido A β 42, el organismo responde fabricando anticuerpos frente a A β 42 y frente a fracciones más cortas que pueden tener también funciones fisiológicas todavía desconocidas, entre algunos de los posibles problemas podemos citar el posible desarrollo de enfermedades autoinmunes debido a la generación de anticuerpos frente a la proteína endógena, dificultad en la generación de una respuesta inmune debido al fallo del sistema inmune para reconocer antígenos endógenos, posible desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda.
- 20 La presente invención está dirigida al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloideas por administración de un péptido, de la parte C-terminal de A β , conjugado con una proteína, que en una realización preferida de la presente invención dicha proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 30 La presente invención se relaciona con una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades amiloideas relacionadas.
- 35 Según una realización preferida de la presente

- invención, se proporciona una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades relacionadas, que supera las desventajas asociadas a usar péptidos, proteínas o
5. inmunógenos endógenos.

Ejemplos de otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son Síndrome Hereditario Islándico, mieloma múltiple, encefalopatías espongiforme,

10 incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

- La inducción de una respuesta inmune puede ser activa como cuando un inmunógeno es administrado para inducir anticuerpos que reaccionan con A β en un paciente, o
- 15 pasiva, como cuando es administrado un anticuerpo que reacciona por sí mismo con A β en un paciente.

Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos son definidos a continuación:

20

- El término "enfermedades amiloideas relacionadas" incluye enfermedades asociadas con la acumulación de amiloide el cual puede estar restringido a un organo, amiloidosis localizada, o difundido en varios organos,
- 25 amiloidosis sistémica. Amiloidosis secundaria puede ser asociada con infecciones crónicas (como p.e. tuberculosis) o inflamación crónica (p.e. artritis reumatoide), Fiebre Mediterránea Familiar (FMF) y otro tipo de amiloidosis sistémica encontrada en pacientes
- 30 en tratamiento de hemodiálisis de largo plazo. Formas localizadas de amiloidosis incluye, sin limitarse a estas, diabetes tipo II y cualquier otra enfermedad relacionada con esta, enfermedades neurodegenerativas con SCRAPIE, encefalitis espongiforme bovina,

enfermedad de Cretzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral.

El término "inmunización pasiva" es utilizado para referirse a la administración de anticuerpos o fragmentos de ellos a un individuo con la intención de conferirle inmunidad.

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso bien de un péptido que actúa como inmunógeno o bien de un anticuerpo, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides. Dichos métodos consisten en la inducción de una respuesta inmune contra un componente peptídico de los depósitos amiloides en el paciente. Dicha inducción puede ser activa por administración de un inmunógeno o pasiva por administración de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo.

En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

El medicamento obtenido puede ser empleado tanto en pacientes asintomáticos como en aquellos que ya muestran síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones capaces de provocar una respuesta inmune dirigida contra ciertos componentes de las placas amiloides son efectivas para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con depósitos amiloides. En particular, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, es posible prevenir el progreso, disminuir los síntomas y/o reducir el proceso de deposición

amiloide en un individuo, cuando una dosis inmunoestimuladora de un péptido o de un anticuerpo obtenido a partir de éste, es administrado a el paciente.

5

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los anticuerpos son obtenidos por inmunización de mamíferos o aves, mediante el empleo de un péptido conjugado a una proteína como inmunógeno.

10

Según una forma de realización preferida de la presente invención, los mamíferos empleados para su inmunización pueden ser rumiantes, équidos, lagomorfos, carnívoros, primates o cualquier otro animal que permita obtener cantidades de suero adecuadas como para extraer de éste suficiente cantidad de anticuerpo. De entre las aves empleadas para su inmunización podemos citar, no considerándose de forma limitativa, las galliformes, anseriformes y columbiformes, entre otras.

20

Según una forma de realización preferida de la presente invención, ésta proporciona el uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.

30

Según una forma de realización más preferida de la presente invención, la proteína utilizada para su conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

35

De acuerdo con una realización aún más preferida de la presente invención, el péptido es seleccionado entre un grupo que consiste en el péptido de SEQ ID NO 1, el
5 péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4 y los
10 péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

15 De acuerdo con otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos
20 resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida de la presente invención,
25 el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las
30 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido es
seleccionado entre el grupo constituido por el péptido
35 de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia

resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, ésta proporciona el uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.

Según una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los

restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

En otra forma de realización más preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o
5 aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las
10 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en
15 el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A= Ala= alanina,
C= Cys= cisteína,
D= Asp= ácido aspártico,
20 E= Glu= ácido glutámico,
F= Phe= fenilalanina,
G= Gly= glicina,
H= His= histidina,
I= Ile= isoleucina,
25 K= Lys= lisina,
L= Leu= leucina,
M= Met= metionina,
N= Asn= asparagina,
P= Pro= prolina
30 Q= Gln= glutamina,
R= Arg= arginina,
S= Ser= serina,
T= Thr= treonina,
V= Val= valina,
35 W= Trp= triptofano,

Y= Tyr= tirosina,

Las secuencias descritas anteriormente en la presente invención, e identificadas como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 se corresponden con las siguientes secuencias de aminoácidos:

| | |
|----------------|--------------|
| SEQ ID NO 1 | LVFFAEDV |
| SEQ ID NO 2 | GLMVGGVV |
| 10 SEQ ID NO 3 | GLMVGGVVIA |
| SEQ ID NO 4 | RHDSGYEVHHQK |

Los anticuerpos obtenidos a partir de los péptidos anteriores reciben en la presente solicitud los códigos de SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4 correspondiéndose con éstos como se indica a continuación:

| | |
|----------------|-------|
| SEQ ID NO 1 | SAR-2 |
| SEQ ID NO 2 | SAR-3 |
| 20 SEQ ID NO 3 | SAR-4 |
| SEQ ID NO 4 | SAR-1 |

La información relativa a la identificación de las secuencias peptídicas, descritas en la presente invención, que se acompaña a la presente memoria en formato legible por ordenador, es idéntica al listado de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Figura 1.- Placas amiloides en cerebros con Alzheimer detectadas con los anticuerpos SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4.

Figura 2.- Western Blot en el que se demuestra la especificidad de los anticuerpos. SAR-3 detecta específicamente la proteína amiloide de 40 aminoácidos (A β 40), SAR-4 la de 42 aminoácidos (A β 42) y SAR-1 las dos isoformas, pero teniendo más afinidad por la supuestamente más neurotóxica A β 42. En cada calle se ha cargado el péptido indicado (A β 40 ó A β 42) en la cantidad de nanogramos especificada (10, 100, 200 ó 500). En los westerns se aprecia también que los anticuerpos SAR-3 y SAR-4 detectan tanto los monómeros (mucho más abundantes) como los dímeros del péptido correspondiente.

EJEMPLOS

15

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

20

Ejemplo 1. Generación de los anticuerpos policlonales.

25

Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.

30

Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

35

Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se prepurificó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz
5 compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

10

Ejemplo 2. WESTERN-BLOT para A β

1. ELECTROFORESIS

15 Se utilizó el método de Laemmli, descrito en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998, modificado para mejorar la separación de péptidos pequeños.

20 El aparato empleado fué un Miniprotean 3 de Bio-Rad.

Se utilizó un gel del 15% de acrilamida, mezclando los siguientes componentes:

25

| SOLUCIONES STOCK | SEPARATING GEL (15 %) | STACKING GEL |
|------------------|-----------------------|--------------|
| 40 % Acrilamida | 3,75 ml | 500 μ l |
| Tris 3 M pH=8,45 | 3,3 ml | 250 μ l |
| Glicerol | 1,05 ml | - |
| 30 Agua | 1,9 ml | 4,2 ml |
| SDS 20 % | 50 μ l | 18,6 μ l |
| APS 10% | 50 μ l | 25 μ l |
| TEMED | 10 μ l | 5 μ l |

Se partió de disoluciones stock de péptido A β 40 y 42 de
35 1 mg/ml. (disueltos en PBS). Se tomó el volumen

necesario de estas soluciones para cada una de las muestras y lo llevamos hasta 20 μ l con SBLT (SBL + Tris base 2 M). A continuación se hirvieron las muestras durante 5 minutos para desnaturalizar los péptidos y
5 eliminar posibles proteasas.

Se llenó el centro de la cubeta con tampón catódico y el exterior con tampón anódico, siendo la composición de estos tampones las siguientes:

10

Tampón Anódico

24.2 g Tris base (0.2 M final)

Diluir a 1 litro con H₂O

Ajustar a pH 8.9 con HCl concentrado

15 Almacenar a 4°C hasta 1 mes

Tampón Catódico

12.11 g Tris base (0.1 M final)

17.92 g tricine (0.1 M final)

20 1 g SDS (0.1% final)

Diluir a 1 litro con H₂O

No ajustar el pH.

Almacenar a 4°C hasta 1 mes

25 Finalmente se cargaron las muestras en los pocillos: 20 μ l/pocillo. Utilizando como marcador el Polypeptide Standard Kaleidoscope de Bio-Rad, se comenzó la migración a bajo voltaje (30 V), y posteriormente se subió hasta los 100 V, transcurrida aprox. 1 hora de
30 electroforesis

2.- TRANSFERENCIA A MEMBRANA

15

Se transfirieron las proteínas separadas en el gel a una membrana de PVDF, mediante el electroblotting. En los "librillos" de transferencia se colocaron:

- 5 Lado negro---esponja---3 papeles Whatmann (o de filtro)--- gel--- membrana--- 3 papeles Whatmann--- esponja--- lado transparente

- 10 A continuación se llenó la cubeta con "electroblotting buffer":

Glicina 38 mM

Tris base 50 mM

Metanol 40%

15

Se realizó la transferencia durante 2 horas a 200 mA. Durante la transferencia se mantuvo la agitación del buffer con agitador magnético.

- 20 3.- INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Los anticuerpos y la leche en polvo se disolvieron en PBS-T (PBS + 0,5 % Tween 20), realizándose los lavados también con PBS-T.

- 25 Tras la transferencia se bloqueó la superficie de la membrana con solución 5 % de leche en polvo, durante 1 hora con agitación y a temperatura ambiente (RT)

Tras lo cual se lavó la membrana 2 x 5 min. a RT.

30

A continuación se incubó con anticuerpo primario (SAR-1, SAR-2, SAR-3 o SAR-4) 1 hora a RT como mínimo diluido 1:500 en PBS-T.

- 35 Se realizó el lavado de la membrana: 3 x 10 min. a RT

Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario:
anti-conejo de cabra conjugado a peroxidasa de rábano
(goat anti-rabbit-HRP) durante 1 hora a RT (1:10.000 en
5 todos los casos).

Se realizó de nuevo el lavado de la membrana: 3 x 10
min. a RT

10 4.- REVELADO

Tras el último lavado se incubó la membrana con la
solución del kit de quimioluminiscencia. Utilizándose
el kit ECL+Plus de Pharmacia.

15

Se envolvió la membrana en papel celofán y la expusimos
a film (Hyperfilm MP de Amersham) de doble emulsión,
durante distintos tiempos, entre 30 seg. y 2 minutos.

20 Ejemplo 3. Inmunohistoquímica con anticuerpos SAR-1,
SAR-2, SAR-3 y SAR-4 en tejido de cerebro humano.

Las secciones de tejido se fijaron en parafina
siguiendo los siguientes pasos:

- 25 a) fijación en formol neutro al 10%
b) deshidratación por pases sucesivos en
concentraciones crecientes de alcohol
c) pases por xilol y parafina, esta última en estufa
de 60-62 °C
30 d) realización de los bloques de parafina, los
cuales se cortan a 4 micras y se montan en
portaobjetos

A continuación, dichas secciones fueron desparafinadas
35 mediante pases por las siguientes soluciones:

| | | | |
|---|--------|------|---------------------|
| | Xilol | 100% | 10 minutos |
| | Xilol | 100% | 10 minutos |
| | Etanol | 100% | 5 minutos |
| 5 | Etanol | 100% | 5 minutos |
| | Etanol | 96% | 5 minutos |
| | Etanol | 90% | 5 minutos |
| | Etanol | 70% | 5 minutos |
| | PBS | | 5 minutos X 3 veces |

10

Posteriormente se trataron de la siguiente forma:

- a) Ácido fórmico al 96% durante 3 minutos en campana de gases y en agitación.
- b) Lavado rápido de agua
- 15 c) Lavados en PBS 2 X 5 minutos
- d) Bloqueo de las peroxidasas endógenas durante 15 minutos en una solución formada por 70ml de PBS, 30ml de metanol y 1ml de H₂O₂
- e) Lavados en PBS 3 X 5 minutos
- 20 f) Lavados en PBS/T (Triton o Tween-20 al 0,5% en PBS) 3 X 5 minutos
- g) Bloqueo de las uniones inespecíficas con suero de cabra (Normal Goat Serum) diluido 10:100 en PBS/T durante dos horas
- 25 h) Incubación de los anticuerpos primarios toda la noche a 4° C en cámara húmeda:
 - SAR-1....Dilución 1:150 en PBS
 - SAR-2....Dilución 1:1500 en PBS
 - SAR-3....Dilución 1:1500 en PBS
 - 30 SAR-4....Dilución 1:2000 en PBS
- i) Lavados de PBS/T 3 X 5 minutos
- j) Incubación en anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra) diluido 1:200 en PBS durante 45 minutos
- k) Lavados de PBS 4 X 5 minutos

l) Incubación del ABC (complejo avidina-biotina) de Vector Labs a una dilución de 1:100 en PBS/T durante 45 minutos en oscuridad, manteniéndose esta condición hasta finalizar el revelado

5 m) Lavados de PBS 3 X 5 minutos

n) Revelado en diaminobencidina (DAB).

Se controló el tiempo empíricamente bajo microscopio estereoscópico. Para ello, primero se hizo un lavado en
10 una solución de Tris-HCl 0.5 M durante 10 minutos en agitación, para proseguir con la incubación con un sustrato diaminobencidina (DAB) diluida en Tris-HCl 0.05M y a la que se añade 0.5 µl/ml de H₂O₂ a 4°C. Una vez finalizada la reacción se realizaron tres lavados
15 en PBS a 4°C de 5 minutos cada uno y se procedió a la deshidratación en etanol al 70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno, pase por xilol de 4 minutos y otro pase de xilol de 2 minutos, hasta que se montaron con Eukitt para su observación al microscopio.

20

Listado de Secuencias.

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

25

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

30

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

35

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

5 TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

10 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15 LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

20 SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

25 CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

30 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. El uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.
2. El uso según la reivindicación anterior caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
3. El uso según la reivindicación anterior 1, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH).
4. El uso según cualquiera de la reivindicaciones anteriores 1 a 3, caracterizado porque el péptido es seleccionado a partir de un grupo que consiste en:
 - el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

5. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 1;
 - 5 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
 - 10 los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
6. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- 15 - el péptido de SEQ ID NO 2;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
 - 20 cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
7. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- 25 - el péptido de SEQ ID NO 3;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
 - 30 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.

8. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 4;
 - 5 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, 10 los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
9. El uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes 15 predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.
- 20 10. El uso según la reivindicación anterior 9, caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 a 10, caracterizado porque el 25 anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en 30 SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para 35 conjuguar la proteína.

12. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido
5 seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 1;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - 10 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
13. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido
15 seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 2;
 - 20 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la
25 conjugación de la proteína.
14. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por
30 inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 3;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
 - 35

- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
5. 15. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- 10 - el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
- 15 cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

21042003.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Zaragoza

<120> Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Síntesis Química

21042003.ST25

<400> 4

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000194

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC⁷ A61K 38/17, A61K 39/00, A61P 25/28 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|--|--|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC⁷ A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS. | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y | WO 9927944 A (ATHENA NEUROSCIENCES, INC., USA), 10.06.1999, the whole document especially page 4, lines 34-39; page 5, lines 1-5, 15-20; page 49, line 5. | 1-4, 7, 9-11, 14 5, 6, 8, 12, 13, 15 |
| X | WO 0072880 A (NEURALAB LIMITED), 07.12.2000, the whole document especially page 61, line 3; pages 67-69. | 4, 7, 11, 14 |
| Y | WO 9615452 A (ATHENE NEUROSCIENCES, INC., USA), 23.05.1996, the whole document especially page 27, line 22; page 20, line 11. | 4, 7, 11, 14 |
| Y | WO 9012870 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC., USA), 01.11.1990, the whole document especially page 6, line 13. | 4, 5, 11, 12 |
| PX | WO 2004013172 A (INNOGENETICS, N.V.), 12.02.2004, SEQ ID n° 74 | 4, 8, 11, 15 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 26 July 2004 (26.07.2004) | | Date of mailing of the international search report 03 August 2004 (03.08.2004) |
| Name and mailing address of the ISA/ SPTO | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000194

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| PY | EP 1371986 A (A-BETA G.m.b.H), 17.12.2003, SEQ ID n° 2. | 4,6,11,13 |
| PY | ES 2201929 A (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, OTRI), 16.03.2004, the whole document. | 4-8,11-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 2004/000194

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9927944 A | 10.06.1999 | CA 2312920 A | 10.06.1999 |
| | | AU 1706199 A | 16.06.1999 |
| | | ZA 9810932 A | 02.07.1999 |
| | | NO 20002784 A | 31.07.2000 |
| | | EP 1033996 A | 13.09.2000 |
| | | EP 19980961833 | 30.11.1998 |
| | | ID 25504 A | 05.10.2000 |
| | | BR 9815357 A | 24.10.2000 |
| | | HR 20000443 A | 31.10.2000 |
| | | CN 1281366 T | 24.01.2001 |
| | | BG 104562 A | 31.01.2001 |
| | | EE 200000379 A | 16.04.2001 |
| | | DE 1033996 T | 07.06.2001 |
| | | PL 342649 A | 18.06.2001 |
| | | HU 0100627 A | 28.06.2001 |
| | | TR 200001608 T | 23.07.2001 |
| | | JP 2002502802 T | 29.01.2002 |
| | | US 6710226 B | 23.03.2004 |
| | | US 2004081657 A | 29.04.2004 |
| | | US 6743427 B | 01.06.2004 |
| | | US 6750324 B | 15.06.2004 |
| WO 0072880 A | 07.12.2000 | CA 2370311 A | 07.12.2000 |
| | | AU 5303100 A | 18.12.2000 |
| | | NO 20015773 A | 25.01.2002 |
| | | BR 0011000 A | 19.02.2002 |
| | | EP 1185298 A | 13.03.2002 |
| | | EP 20000937919 | 26.05.2000 |
| | | TR 200103447 T | 22.04.2002 |
| | | GB 2368794 A | 15.05.2002 |
| | | DE 10084643 T | 11.07.2002 |
| | | CN 1359301 T | 17.07.2002 |
| | | HU 0201250 A | 28.08.2002 |
| | | BG 106241 A | 30.08.2002 |
| | | SK 16982001 A | 06.11.2002 |
| | | CZ 20013824 A | 13.11.2002 |
| | | TR 200202231 T | 21.11.2002 |
| | | ZA 200109487 A | 17.02.2003 |
| | | EE 200100626 A | 17.02.2003 |
| | | JP 2003517461 T | 27.05.2003 |
| | | US 6710226 B | 23.03.2004 |
| | | NZ 515403 A | 28.05.2004 |
| | | US 6743427 B | 01.06.2004 |
| | | US 6750324 B | 15.06.2004 |
| WO 9615452 A | 23.05.1996 | CA 2205359 A | 23.05.1996 |
| | | AU 4154496 A | 06.06.1996 |
| | | EP 0792458 A | 03.09.1997 |
| | | EP 19950939892 | 13.11.1995 |
| | | JP 10509797 T | 22.09.1998 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 2004/000194

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|--|
| | | AU 705907 B | 03.06.1999 |
| | | US 6114133 A | 05.09.2000 |
| | | JP 2004077499 A | 11.03.2004 |
| WO 9012870 A | 01.11.1990 | AU 5525090 A | 16.11.1990 16.11.1990 16.11.1990 |
| WO2004013172 A | 12.02.2004 | NONE | ----- |
| EP 1371986 A | 17.12.2003 | EP 20020012583 | 06.06.2002 |
| | | WO 03104812 A | 18.12.2003 |
| ES 2201929 A | 16.03.2004 | WO 2004024770 A | 25.03.2004 25.03.2004 25.03.2004 |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2004/000194

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 38/17, A61K 39/00, A61P 25/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones n° |
|------------|--|--|
| X Y | WO 9927944 A (ATHENA NEUROSCIENCES, INC., USA), 10.06.1999, todo el documento especialmente página 4, líneas 34-39; página 5, líneas 1-5, 15-20; página 49, línea 5. | 1-4, 7, 9-11, 14 5,6,8,12,13,15 |
| X | WO 0072880 A (NEURALAB LIMITED), 07.12.2000, todo el documento, especialmente página 61, línea 3; páginas 67-69. | 4,7,11,14 |
| Y | WO 9615452 A (ATHENE NEUROSCIENCES, INC., USA), 23.05.1996, todo el documento especialmente página 27, línea 22; página 20, línea 11. | 4,7,11,14 |
| Y | WO 9012870 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC., USA), 01.11.1990, todo el documento especialmente página 6, línea 13. | 4,5,11,12 |
| PX | WO 2004013172 A (INNOGENETICS, N.V.), 12.02.2004, SEQ ID n° 74 | 4,8,11,15 |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

26 Julio 2004 (26.07.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

03 AGO 2004 03.08.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495552

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
|--|--|--|
| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
| PY | EP 1371986 A (A-BETA G.m.b.H), 17.12.2003, SEQ ID nº 2. | 4,6,11,13 |
| PY | ES 2201929 A (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, OTRI), 16.03.2004, todo el documento. | 4-8,11-15 |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000194

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver hoja adicional

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000194

La solicitud de patente no tiene unidad de invención ya que comprende más de una sola invención o grupos de invenciones descritos a continuación:

- 1.- Uso del péptido SEQ ID n° 1 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
- 2.- Uso del péptido SEQ ID n° 2 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
- 3.- Uso del péptido SEQ ID n° 3 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 4.- Uso del péptido SEQ ID n° 4 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000194

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:

a) Tipo de material

☒ una lista de secuencias

☐ Tabla(s) relativas a la lista de secuencias

b) Formato del material

☐ por escrito

☒ en soporte legible por ordenador

c) Fecha de presentación/entrega

☐ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó

☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador

☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000194

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|--|-------------------------|---|-------------------------|
| WO 9927944 A | 10.06.1999 | CA 2312920 A | 10.06.1999 |
| | | AU 1706199 A | 16.06.1999 |
| | | ZA 9810932 A | 02.07.1999 |
| | | NO 20002784 A | 31.07.2000 |
| | | EP 1033996 A | 13.09.2000 |
| | | EP 19980961833 | 30.11.1998 |
| | | ID 25504 A | 05.10.2000 |
| | | BR 9815357 A | 24.10.2000 |
| | | HR 20000443 A | 31.10.2000 |
| | | CN 1281366 T | 24.01.2001 |
| | | BG 104562 A | 31.01.2001 |
| | | EE 200000379 A | 16.04.2001 |
| | | DE 1033996 T | 07.06.2001 |
| | | PL 342649 A | 18.06.2001 |
| | | HU 0100627 A | 28.06.2001 |
| | | TR 200001608 T | 23.07.2001 |
| | | JP 2002502802 T | 29.01.2002 |
| | | US 6710226 B | 23.03.2004 |
| | | US 2004081657 A | 29.04.2004 |
| | | US 6743427 B | 01.06.2004 |
| | | US 6750324 B | 15.06.2004 |
| WO 0072880 A | 07.12.2000 | CA 2370311 A | 07.12.2000 |
| | | AU 5303100 A | 18.12.2000 |
| | | NO 20015773 A | 25.01.2002 |
| | | BR 0011000 A | 19.02.2002 |
| | | EP 1185298 A | 13.03.2002 |
| | | EP 20000937919 | 26.05.2000 |
| | | TR 200103447 T | 22.04.2002 |
| | | GB 2368794 A | 15.05.2002 |
| | | DE 10084643 T | 11.07.2002 |
| | | CN 1359301 T | 17.07.2002 |
| | | HU 0201250 A | 28.08.2002 |
| | | BG 106241 A | 30.08.2002 |
| | | SK 16982001 A | 06.11.2002 |
| | | CZ 20013824 A | 13.11.2002 |
| | | TR 200202231 T | 21.11.2002 |
| | | ZA 200109487 A | 17.02.2003 |
| | | EE 200100626 A | 17.02.2003 |
| | | JP 2003517461 T | 27.05.2003 |
| | | US 6710226 B | 23.03.2004 |
| | | NZ 515403 A | 28.05.2004 |
| | | US 6743427 B | 01.06.2004 |
| | | US 6750324 B | 15.06.2004 |
| WO 9615452 A | 23.05.1996 | CA 2205359 A | 23.05.1996 |
| | | AU 4154496 A | 06.06.1996 |
| | | EP 0792458 A | 03.09.1997 |
| | | EP 19950939892 | 13.11.1995 |
| | | JP 10509797 T | 22.09.1998 |

Información relativa a miembros de familias de patentes

PCT/ES 2004/000194

Formulario PCT/ISA/210 (anexo familia de patentes) (Enero 2004)